



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 18 MAY 1999

WIPO

PCT

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 MAI 1999

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

28 AVR 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 05329 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

fs

28.04.98

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET LAVOIX**  
**2 Place d'Estienne d'Orves**  
**75441 PARIS CEDEX 09**

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

**BFT 98/0194**

**53-20-14-20**

2 DEMANDE—Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Séquences nucléotidiques pour la détection des Escherichia Coli entérohémorragiques (EHEC) .**

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS**

Forme juridique

Nationalité (s)

**Française**

Adresse (s) complète (s)

**3, Boulevard Raymond Poincaré 92430 NARNES LA COQUETTE**

Pays

**FR**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

**CABINET LAVOIX**  
**H. ORDEWSKY n° 92.1186**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

### DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 05 329

**TITRE DE L'INVENTION :** Séquences nucléotidiques pour la détection des  
**Escherichia Coli entérohémorragiques (EHEC).**

### LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS**

**3, Boulevard Raymond Poincaré 92430 MARNES LA COQUETTE FRANCE**

**DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**FRECHON Dominique, Thérèse, Marie**  
(Nom de jeune fille **MOBIAN**)  
**22 avenue de Saint Ouen**  
**75018 PARIS FRANCE**

**LAURE Françoise, Claudine**  
**6 rue des Couronnes**  
**75020 PARIS FRANCE**

**THIERRY Dominique (Monsieur)**  
**4 rue des Longs Prés**  
**92100 BOULOGNE FRANCE**

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

**Paris, le 11 Juin 1998**

**CABINET LAVOIX**

**M. MONCHENY n° 92.1179**

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
38 & 41	42		X	26.08.98	01 SEP. 1998 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

L'invention a pour objet deux séquences nucléiques d'origine plasmidique, présentes chez les bactéries du groupe *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), l'utilisation desdites séquences pour la recherche des EHEC, notamment ceux possédant les gènes codant pour les facteurs de virulence, entérohémolysine et intimine, et plus particulièrement la détection spécifique du sérotype O157 :H7. L'invention vise également un procédé mettant en œuvre lesdites séquences ainsi que les trousse de détection les contenant.

Les bactéries du groupe EHEC appartiennent à la famille des *Escherichia coli* producteurs de vérotoxines ou VTEC, responsables de syndromes diarrhéiques dont les conséquences peuvent être fatales chez l'homme. En particulier, les EHEC peuvent engendrer des colites hémorragiques (CH), et éventuellement l'apparition de complications majeures comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombopénique (Griffin et Tauxe, *Epidemiol. Rev.* 13, 1991, 60-98).

Aussi, l'incidence de ces infections sur la santé publique est telle, qu'elle implique un contrôle accru des denrées alimentaires et des moyens de détections rapides, notamment en cas d'épidémies.

20

Plusieurs sérotypes, appartenant au groupe EHEC ont été identifiés et rendus responsables de différents foyers épidémiques : O157 :H7, O26 :H11, O111 :NM, O103 :H2, O145 :NM etc (A. Cheson et Keush, *ASM News* 62, 1996, 302-306). Cependant, c'est le sérotype O157 :H7 qui a été le plus fréquemment isolé.

25

Les méthodes de détection traditionnelles consistent à identifier les bactéries ou à déceler les toxines sécrétées par celles-ci. La détection de *E. coli* O157 :H7 est principalement réalisée sur la base du sérotypage, associé à la recherche de propriétés métaboliques, comprenant l'absence de fermentation du sorbitol et/ou l'absence d'activité  $\beta$ -glucuronidase. Il n'existe pas, par ailleurs, de méthode bactériologique propre à la détection des EHEC, mais des tests permettant d'orienter le diagnostic. En particulier, l'utilisation de géloses

30

supplémentées avec du sang lavé permet de mettre en évidence le caractère entérohémolytique, généralement présent chez les EHEC.

De manière générale, les méthodes bactériologiques et immunologiques  
5 relatives à la détection de *E. coli* O157:H7 sont longues, fastidieuses,  
relativement coûteuses et nécessitent une confirmation sérologique. Par ailleurs,  
ces méthodes ne permettent pas d'établir une identification de *E. coli* O157:H7  
du fait des réactions croisées avec d'autres genres et espèces bactériens, ce qui  
rend l'interprétation difficile.

10

L'utilisation de sondes nucléiques est donc apparue comme une  
alternative à ces méthodes traditionnelles. Des efforts importants ont été réalisés  
pour développer des sondes, capables de détecter d'une manière sensible et  
spécifique les bactéries *E. coli* de type EHEC, impliquées dans les cas de CH  
15 et/ou SHU, et dont le prototype le plus répandu est *E. coli* O157:H7.

En particulier, des sondes ou fragments, permettant la détection des  
gènes responsables de la virulence des *E. coli*, encore appelés facteurs de  
virulence, ont été publiés. Toutefois, aucun des facteurs de virulence  
20 actuellement connu ne permet à lui seul d'identifier des souches pathogènes de  
*E. coli* O157:H7 ou des EHEC.

Ainsi, l'utilisation de sondes ou fragments nucléiques pour la détection  
des gènes codant pour les vérotoxines (*vt1* ou *st1*, *vt2* ou *st2*), décrite par de  
25 nombreux groupes de recherche (Karch et Meyer, *J. Clin Microbiol.* 27, 1989,  
2751-2757 ; Gannon et al., *Appl. Env. Microbiol.* 58, 1992, 3809-3815 ; Begum  
et al., *J. Clin. Microbiol.* 31, 1993, 3153-3156 ; Witham et al., *Appl. Env.  
Microbiol.* 62, 1996, 1347-1353), a montré que les gènes codant pour les  
vérotoxines sont associés aux souches bactériennes pathogènes *E. coli*  
30 O157:H7 et autres EHEC, mais peuvent aussi être présents chez des souches  
*E. coli* non pathogènes, ou éventuellement chez d'autres genres bactériens  
comme *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter freundii*, etc.

De même, la protéine d'adhésion dénommée intimine est également impliquée dans la virulence des bactéries de type EHEC. Des sondes ont été notamment sélectionnées sur le gène correspondant (*eae*) par Gannon *et al.* dans *J. Clin. Microbiol.* 31, 1993, 1268-1274, Louie *et al.* dans *Epidemiol. Infect.* 112, 1994, 449-461 et Meng *et al.* dans *Int. J. Food Microbiol.* 32, 1996, 103-113. Cependant, bien que ce facteur de virulence soit étroitement associé au groupe des EHEC, il est également rencontré chez les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) comprenant le sérotype O55 :H7.

Enfin, des sondes ont été sélectionnées sur un plasmide de 60 MDa, codant entre autres pour l'entérohémolysine, facteur de virulence également présent chez de nombreux EHEC (Levine *et al.*, *J. Infect. Dis.* 156, 1987, 175-182 ; Schmidt *et al.*, *Infect. Immun.* 63, 1995, 1055-1061). Ainsi, le brevet US 5,475,098 vise les séquences nucléiques contenues dans l'opéron de l'entérohémolysine, correspondant aux gènes *hlyA*, *hlyB* et à la région intergénique *hlyA-hlyB*. Les séquences oligonucléotidiques revendiquées permettent une détection spécifique des EHEC, mais l'invention ne permet pas de différencier *E. coli* O157 :H7 des autres EHEC. Par ailleurs, le brevet US 5,652,102, décrit une séquence nucléique située sur un fragment de restriction issu du plasmide de 60 MDa. Cependant, l'utilisation d'oligonucléotides dérivés de cette séquence dans une réaction de polymérase en chaîne ou "Polymerase Chain Reaction" (PCR), ne permet pas à elle seule l'identification spécifique du sérotype O157 :H7, et nécessite par conséquent l'utilisation conjointe d'amorces amplifiant les gènes codant pour les vérotoxines et l'intimine.

25

Dernièrement, la demande de brevet WO 97/32045 vise des oligonucléotides sélectionnés à partir d'une séquence chromosomique obtenue par la méthode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), conduisant à la détection d'environ 99,5 % de *E. coli* O157 :H7, mais les séquences nucléiques revendiquées détectent également près de 3 % de *E. coli* non EHEC, ce qui n'est pas satisfaisant en terme de spécificité, notamment dans le domaine de l'agro-alimentaire.

30



L'inconvénient majeur de tous ces systèmes de détection réside donc dans le fait qu'aucun d'entre eux, ne permet d'établir clairement et simplement l'identification du sérotype *E. coli* O157:H7. Il est en effet très souvent nécessaire d'associer plusieurs systèmes d'amplification et/ou de détection pour  
5 rendre le résultat précis. Les protocoles utilisés sont alors difficiles à mettre en œuvre (amplifications multiples, simultanées) et les résultats obtenus quant à la sensibilité et à la spécificité sont fortement dépendants, non seulement des cibles nucléiques utilisées, mais aussi des conditions opératoires.

10 Or, comme il a été précédemment indiqué, ce sérotype peut provoquer de graves syndromes pouvant conduire à la mort, ce qui implique des moyens rapides et fiables de détection, notamment en cas d'épidémie.

Les travaux des inventeurs ont consisté à rechercher des séquences  
15 spécifiques à partir d'une banque génomique de *E. coli* O157:H7, permettant la reconnaissance des principaux sérotypes de *E. coli* pathogènes pour l'homme, et plus particulièrement O157:H7. La banque a été criblée contre *E. coli* entéropathogène O55:H7, ancêtre supposé du sérotype O157:H7, les deux génomes étant extrêmement proches d'après les analyses de polymorphisme  
20 réalisées par T. Whittam *et al.* dans *Infect. Immun.* 61, 1993, 1619-1629.

Ces travaux ont permis d'isoler deux fragments nucléiques d'intérêt pour la détection des EHEC et plus particulièrement pour la détection de *E. coli* O157:H7, comprenant les séquences nucléiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2,  
25 situées sur le plasmide entérohémolytique de 60 MDa. Les clones correspondants pDF3 et pDF4 contenant ces séquences ont été déposés auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, respectivement sous les numéros I-1999 et I-2000, le 26 mars 1998.

30 D'une façon surprenante, il a été mis en évidence une première séquence (SEQ ID N°1) comprenant l'association stable d'une partie de la séquence d'insertion IS91 et de la séquence issue du gène *katP* de *E. coli* O157:H7 ou

d'une partie de celle-ci, l'enchaînement nucléique en résultant, jamais décrit par ailleurs, étant spécifiquement retrouvé chez *E. coli* O157 :H7.

5 Le gène *katP*, codant pour une catalase-péroxydase, est présent sur le plasmide entérohémolytique de *E. coli* O157 :H7 et de nombreuses EHEC (*Brunder et al., Microbiol. 142, 1996, 3305-3315*), et la séquence d'insertion IS91, identifiée sur les plasmides  $\alpha$ -hémolytiques de *E. coli* (*Zabala et al., J. Bacteriol. 151, 1982, 472-476*), n'a encore jamais été décrite chez les souches entérohémolytiques de type *E. coli* O157 :H7.

10

La mise en évidence d'une séquence d'insertion tronquée au niveau de la jonction IS91-*katP* (absence de la séquence inversée répétée gauche (IR<sub>L</sub>) de l'IS91) suggère aussi une intégration stable de l'IS91 dans cette partie du génome de *E. coli* O157 :H7.

15

L'analyse des produits amplifiés d'un grand nombre de souches O157 :H7 d'origines diverses démontre la conservation de cet enchaînement nucléotidique au sein du sérotype O157 :H7.

20

En effet, un produit amplifié de 670 paires de bases a été observé chez toutes les souches testées (55 *E. coli* O157 :H7 et 1 *E. coli* O157 :H-) avec les amorces SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4, situées respectivement dans les séquences IS91 et *katP*.

25

Par ailleurs, les données obtenues à partir des profils de restriction *AluI* et *RsaI* effectués sur les produits amplifiés de 5 souches O157 :H7 d'origines différentes, ainsi que l'analyse de séquence réalisée chez 3 souches, dont 2 isolées d'épidémies (USA, 1993 et Japon, 1996) ont montré une parfaite conservation c'est à dire 100 % d'homologie dans la partie de séquence analysée (SEQ ID N° 1 : positions (nt) 272 à 624).

30

De plus, l'enchaînement nucléotidique, stable et conservé, est probablement un événement de recombinaison relativement ancien, survenu

chez *E. coli* O157 :H7 au cours de l'évolution, puisque des souches isolées en des lieux et des époques différents présentent cette même caractéristique.

Cette séquence représente donc une cible de choix pour la détection  
5 spécifique du sérotype O157 :H7.

Une seconde séquence a été caractérisée (SEQ ID N°2) sur le même plasmide, associée à la présence des facteurs de virulence entérohémolysine (*ehly*) et intimine (*eae*), caractères propres aux souches de *E. coli*  
10 entérohémorragiques, comprenant le sérotype O157 :H7. A ce titre, ce fragment présente un intérêt épidémiologique, car, à la différence des procédés déjà connus, nécessitant la mise en œuvre de plusieurs systèmes moléculaires (*Paton et Paton, J. Clin. Microbiol. 36, 1998, 598-602*), l'utilisation de cette séquence pour une application diagnostique donne lieu à une mise en œuvre  
15 simplifiée et à une interprétation plus rapide des résultats.

La présente invention a donc pour objet les séquences nucléiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, leurs séquences complémentaires, les séquences dérivées de celles-ci et les fragments utilisables pour la détection spécifique des  
20 EHEC, dans un échantillon alimentaire, clinique ou vétérinaire, ou de l'environnement.

La présente invention a plus particulièrement pour objet une séquence spécifique pour la détection du sérotype *E. coli* O157 :H7, comprenant la  
25 séquence SEQ ID N°1, un fragment de cette séquence ou une séquence dérivée de celle-ci.

Selon l'invention, la séquence SEQ ID N°1 comprend un enchaînement nucléotidique résultant d'un événement de recombinaison stable entre la  
30 séquence du gène *katP* ou une partie de celle-ci et une séquence d'insertion IS91 tronquée.

Selon la présente invention, on entend par séquence nucléique aussi bien la séquence d'ADN ou d'ADN complémentaire (ADNc), ou encore la séquence d'ARN correspondante.

5 L'invention concerne aussi des séquences nucléiques dérivées de la SEQ  
— ID N°1 ou la ~~SEQ ID N°2~~, c'est à dire des séquences différant par mutation,  
insertion, délétion et/ou substitution d'une ou plusieurs bases mais s'hybridant  
néanmoins, dans des conditions de forte stringence, avec l'une des susdites  
séquences.

10

Selon l'invention, on entend par forte stringence des conditions de  
température et de force ionique telles qu'elles permettent une hybridation  
spécifique entre deux fragments d'acides nucléiques complémentaires et limitent  
les fixations aspécifiques (*Sambrook et al. , Molecular Cloning, Second Edition*  
15 (1989), 9.47-9.62). Les conditions de température sont généralement comprises  
entre ( $T_m$  moins 5°C) et ( $T_m$  moins 10°C) lorsque l'une des séquences de l'hybride  
est courte (une vingtaine de nucléotides),  $T_m$  étant la température théorique de  
fusion, définie comme étant la température à laquelle 50 % des brins appariés se  
séparent.

20

On entend également selon l'invention, par séquence nucléique dérivée  
de la SEQ ID N° 1, toute séquence différant de celle-ci par mutation, insertion,  
délétion et/ou substitution d'une ou plusieurs bases et comportant un  
enchaînement de recombinaison stable entre le gène *katP* et la séquence  
25 d'insertion IS91 tronquée.

Plus particulièrement, les séquences nucléiques contiennent au moins 8  
nucléotides, préférentiellement 10 nucléotides, ou très préférentiellement 14  
nucléotides consécutifs de l'enchaînement de la Figure 1, et comprennent les  
30 nucléotides de la position 400 à la position 407.

La présente invention a également pour objet une seconde séquence,  
spécifique des EHEC, qui est la SEQ ID N°2, les séquences complémentaires de

celles-ci, les fragments de celles-ci et les séquences dérivées de celles-ci, ces séquences étant toujours détectées chez les EHEC possédant les gènes codant pour l'entérohémolysine (*ehly*) et l'intimine (*eae*) ; ladite séquence SEQ ID N° 2 étant représentée à la Figure 2.

5

L'invention se rapporte également à des fragments oligonucléotidiques, issus des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, utilisables comme amorces dans un processus d'amplification ou comme sonde dans le cadre de la mise en œuvre d'un procédé de détection, comprenant au moins 8, avantageusement au moins 10, plus avantageusement 14 nucléotides, et de préférence jusqu'à 30 nucléotides consécutifs de l'enchaînement nucléotidique de SEQ ID N°1 ou de SEQ ID N°2, lesdites amorces étant susceptibles de s'hybrider aux dites séquences dans des conditions de forte stringence, telles que définies ci-dessus.

15

Les amorces ou sondes de l'invention comprennent également des oligonucléotides pouvant être modifiés par substitution et/ou addition et/ou suppression de plusieurs nucléotides, ou par l'addition à l'une des extrémités (généralement en 5' pour les amorces ; 3' ou 5' pour les sondes) d'une séquence nucléique étrangère à la séquence recherchée, ou encore d'une molécule de marquage, lesdits oligonucléotides étant néanmoins capables de s'hybrider dans des conditions de forte stringence avec des séquences nucléiques complémentaires présentes chez *E. coli* O157 :H7 ou chez les EHEC.

20

25

Selon un mode préféré de l'invention, les oligonucléotides peuvent être utilisés comme amorces, dans un processus d'amplification génique, conduisant à l'obtention d'une quantité importante de copies d'un fragment de SEQ ID N° 1 ou d'un fragment de SEQ ID N° 2 et permettant respectivement, la détection spécifique de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC.

30

L'étape d'amplification peut être réalisée par toute méthode utilisant les techniques classiques d'amplification enzymatique de l'ADN ou de l'ARN, telles que notamment, la technique TAS (Transcription-based Amplication System)

proposée par Kwoh *et al.* dans *PNAS*, 86, 1989, 1173-1177, la technique 3SR (Self-Sustained Sequences Replication) décrite par Fahy *et al.* dans *PCR Meth. Appl.* 1, 1991, 25-33, la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) décrite dans le brevet EP 329 822, ou encore la technique SDA  
5 (Strand Displacement Amplification) décrite par Walker *et al.* dans *P.N.A.S.*, 89, 1992, 392-396, ou avantageusement la technique PCR telle que décrite notamment dans les brevets Européens, EP 200 362 et EP 201 184, délivrés au nom de Cetus, ou encore les techniques dérivées de ces dernières et toute méthode visant à amplifier *in vitro* les séquences nucléiques.

10

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les oligonucléotides issus des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 sont utilisés en PCR.

La détection des produits amplifiés peut être réalisée par électrophorèse  
15 sur gel de tout ou partie du milieu réactionnel dans lequel l'amplification a été effectuée, notamment sur gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou par électrophorèse capillaire ou par chromatographie. La visualisation d'une bande de fragments nucléiques localisée en un point spécifique du gel permet d'en apprécier la taille, l'intensité de cette bande pouvant être corrélée  
20 grossièrement au nombre de copies initiales de la cible à détecter dans l'échantillon.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les oligonucléotides, tels que définis ci-dessus, peuvent être utilisés comme sondes dans un  
25 processus d'hybridation pour la détection directe d'une séquence nucléique cible ou après amplification pour la détection des produits amplifiés.

A titre d'illustration, les fragments nucléotidiques peuvent être marqués par un élément radioactif (par exemple  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ) ou par une molécule  
30 non radioactive notamment biotine, acétylamino-fluorène, fluorochrome, digoxigénine, ou par une molécule enzymatique, ou un haptène. Des exemples de marquages non radioactifs de sondes sont décrits, par exemple, dans le brevet français de *P. Kourilsky* n° 78.10975, ou par *M.S. Urdea et al.*, *Nucleic*

*Acids Symp. Ser.*, 24, 1991, 197-200, ou encore par R. Sanchez-Pescador, *J. Clin. Microbiol.* 26, 1988, 1934-1938.

La méthode d'hybridation la plus générale consiste à immobiliser l'acide  
5 nucléique extrait de l'échantillon à analyser sur un support (nitro-cellulose,  
nylon, polystyrène, etc. ) et à incuber dans des conditions définies de  
température et de force ionique, l'acide nucléique immobilisé avec la sonde.  
Après hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides  
formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité,  
10 de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Les molécules hybrides formées peuvent également être détectées sans  
qu'il soit nécessaire de séparer les phases « liée » et « non liée ». On dit alors  
que la détection s'effectue en phase homogène. Ces méthodes, telles que  
15 décrites par T. Walker *et al. Clin. Chemistry* 42, 1996, 9-13 et L. Morrison  
(*Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, 1992, 312-352*)  
concernent notamment la polarisation de fluorescence, dans laquelle une sonde  
est marquée à la fluoresceine et où l'hybridation entraîne une modification de la  
fluorescence, ou encore le transfert d'énergie. Dans ce dernier cas, la détection  
20 repose sur des interactions inter ou intramoléculaires entre deux marqueurs. Un  
premier marqueur appelé « donneur » est excité par absorption d'une lumière à  
une longueur d'onde particulière. L'énergie est transférée à un second marqueur  
appelé « accepteur », qui est à son tour excité et émet de l'énergie.

25 Les sondes oligonucléotidiques peuvent également être mises en œuvre  
au sein d'un dispositif de détection comprenant un arrangement matriciel  
d'oligonucléotides dans lequel, des oligonucléotides d'une longueur donnée,  
sont fixés dans un ordre prédéterminé sur un support et se chevauchent les uns  
par rapport aux autres d'une ou plusieurs bases ; chaque oligonucléotide étant  
30 complémentaire d'une séquence d'ADN ou d'ARN de la séquence cible à  
détecter. La séquence cible, avantageusement marquée est mise en contact  
avec le dispositif matriciel et peut s'hybrider aux sondes fixées sur le support. Un  
traitement enzymatique permet ensuite d'éliminer les hybrides incomplets.

Connaissant la séquence d'une sonde à une position déterminée de la matrice, il est ainsi possible de déduire la séquence nucléotidique de la séquence cible analysée et de déduire les mutations éventuellement survenues.

5            Une alternative à l'utilisation d'une séquence marquée peut consister en  
— l'utilisation d'un support permettant une détection « bioélectronique » de  
l'hybridation de la séquence cible sur les sondes fixées sur le support d'un  
matériau, tel que l'or, capable d'agir, par exemple, en tant que donneur  
d'électrons aux positions de la matrice auxquelles un hybride est formé. La  
10 détection de la séquence nucléique cible est alors déterminée par un dispositif  
électronique. Un exemple de réalisation d'un biocapteur est décrit dans la  
demande de brevet EP-0721 016 au nom d'Affymax Technologies.

15            Selon un mode simple et avantageux de mise en œuvre, les sondes  
nucléiques peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, la  
sonde dite « sonde de capture » est immobilisée sur un support et sert à  
capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible à partir de l'échantillon  
à tester. Si nécessaire, le support solide est séparé de l'échantillon et le duplex  
formé entre la sonde de capture et la séquence d'acide nucléique cible est  
20 ensuite détecté grâce à une seconde sonde dite « sonde de détection »,  
marquée par un élément détectable. Avantageusement, les sondes de capture et  
de détection sont complémentaires de deux régions différentes comprises dans  
la séquence cible (amplifiée ou non) à détecter.

25            La fixation de la sonde de capture sur le support solide peut se faire selon  
des procédés bien connus de l'homme du métier, notamment par adsorption  
passive ou par couplage covalent (*Cook et al., Nucleic Acids Res.* 16, 1988,  
4077-4095 ; *Nagata et al., FEBS Lett.* 183, 1985, 379-382 ; *M. Longlaru et al.,*  
*EP 420 260 A2* ; *T. Gingeras et al., EP 276 302* ; *E. Hornes et LM. Kornes, EP*  
30 *446 260*).

L'hybridation des sondes de capture et de détection peut se faire  
séparément (en deux temps) ou simultanément (en un temps), notamment selon



l'une des méthodes décrites par Langhale et Malcolm, *Gene* 36, 1985, 201-210 ou par Ranki *et al*, *Gene* 21, 1993, 77-85, par Dunn et Hassel, *Cell*, 12, 1977, 23-36 ou encore par Ranki et Soderlund dans les brevets US 4,486,539 et US 4,563,419.

5

La présente demande a donc également pour objet des oligonucléotides, issus de SEQ ID N°1 ou de SEQ ID N°2, sélectionnés comme amorces ou comme sondes, susceptibles de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence d'acide nucléique cible contenue dans l'échantillon testé, spécifiques de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC.

10

On entend par séquence nucléique cible, toute molécule d'ADN ou ADNc ou d'ARN capable de s'hybrider dans des conditions de forte stringence avec un oligonucléotide selon l'invention.

15

Les oligonucléotides préférés dont les séquences sont spécifiées en annexe correspondent aux positions sur les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 rapportées dans le tableau ci-après :

	Séquence	Position dans SEQ ID N°1
20	SEQ ID N°3 :	9 - 30
	SEQ ID N°4 :	679 - 658
	SEQ ID N°5 :	6 - 30
25	SEQ ID N°6 :	682 - 658
	SEQ ID N°7 :	241 - 263
	SEQ ID N°8 :	47 - 69
	SEQ ID N°9 :	251 - 274
	SEQ ID N°10 :	426 - 401
30	SEQ ID N°11 :	427 - 402
	SEQ ID N°12 :	391 - 421
	SEQ ID N°13 :	387 - 417
	SEQ ID N°14 :	291 - 321

	SEQ ID N°15 :	510 - 540
	SEQ ID N°16 :	331 - 350
	SEQ ID N°17 :	68 - 87
	SEQ ID N°18 :	397 - 410
5	SEQ ID N°19 :	396 - 411
	SEQ ID N°20 :	395 - 412

		SEQ ID N°2
10		
	SEQ ID N°21 :	718 - 739
	SEQ ID N°22 :	1099 - 1078
	SEQ ID N°23 :	41 - 60
	SEQ ID N°24 :	884 - 863
15	SEQ ID N°25 :	928 - 958
	SEQ ID N°26 :	970 - 1000
	SEQ ID N°27 :	883 - 903

L'invention concerne aussi des couples d'oligonucléotides, tels  
20 que décrits précédemment, susceptibles d'être utilisés comme amorces pour  
l'amplification d'une séquence nucléique cible correspondant à SEQ ID N°1 ou  
SEQ ID N°2, contenue dans le génome de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC :

Les couples d'amorces préférées sont les suivants :

- pour l'amplification de *E. coli* O157 :H7 :  
25
  - SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4
  - SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6
  - SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7
  - SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 8
  - SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 9
- 30 • pour l'amplification des EHEC :
  - SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22
  - SEQ ID N° 23 et SEQ ID N° 24

Ainsi, l'utilisation du couple d'amorces SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 pour réaliser l'amplification de l'acide nucléique de *E. coli* O157:H7 conduit à l'amplification d'un fragment nucléique de 676 pb, caractéristique des souches de *E. coli* O157:H7. La spécificité de ce fragment peut être éventuellement  
5 contrôlée par l'utilisation de la sonde SEQ ID N° 18.

De même, l'utilisation du couple d'amorces SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22 amplifie spécifiquement une séquence nucléique de 382 pb, présente chez les EHEC, possédant aussi les caractères entérohémolysine et  
10 intimine. Les bactéries appartenant aux autres groupes de *E. coli*, comme les ETEC (*E. coli* producteurs d'entérotoxines), les EPEC etc, ne sont pas détectées. La spécificité du produit amplifié peut être par ailleurs confirmée à l'aide de sondes oligonucléotidiques internes au fragment amplifié, telles que  
SEQ ID N°27.

15

La présente invention a également pour objet des oligonucléotides, tels que précédemment décrits, susceptibles d'être utilisés comme sondes pour la détection d'une séquence de nucléotides, éventuellement amplifiée. Par exemple, les séquences oligonucléotidiques SEQ ID N° 14, SEQ ID N°15 et SEQ  
20 ID N° 18 peuvent être utilisées pour la détection spécifique de *E. coli* O157:H7. De même, l'utilisation des séquences SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26 et SEQ ID N° 27 permet la détection des EHEC dont O157:H7.

L'invention a également pour objet les plasmides contenant les séquences  
25 SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 mentionnées précédemment ainsi que les cellules hôtes les contenant.

L'invention vise aussi un procédé pour la détection *in vitro* de *E. coli* O157:H7 ou des EHEC dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 1. la mise en contact de l'échantillon avec l'un des couples d'amorces, tels que décrits ci-dessus, l'acide nucléique contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, rendu accessible à l'hybridation des amorces à l'acide nucléique de la cible recherchée,

2. l'amplification de la séquence nucléique encadrée par le couple d'amorces choisi,

3. la vérification de la présence éventuelle du produit amplifié pouvant s'effectuer selon une méthode connue de l'homme du métier, telle que  
5 précédemment décrite.

---

Selon un mode de réalisation avantageux, les fragments amplifiés peuvent être détectés selon le principe de la méthode dite « sandwich ».

10 Entre également dans le cadre de l'invention, un procédé pour la détection *in vitro* de séquences nucléotidiques spécifiques de *E. coli* O157:H7 ou des EHEC, préalablement amplifiées par détection sur un support, par exemple une plaque de micro-titration et, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 - dénaturation de la séquence amplifiée de *E. coli* O157:H7 et/ou des EHEC par un moyen physique ou chimique. On préférera l'addition d'une solution dénaturante composée de 200 mM NaOH, 40 mM EDTA,

- mise en contact, dans un tampon d'hybridation approprié des fragments amplifiés dénaturés avec, d'une part au moins une sonde de capture fixée sur le  
20 support, et d'autre part, au moins une sonde nucléique de détection libre dans le tampon d'hybridation, éventuellement marquée, susceptible de s'hybrider avec le même brin des fragments amplifiés que celui avec lequel la sonde de capture est hybridée, mais en une région distincte de celle hybridée avec la sonde capture ; ladite solution d'hybridation pouvant être avantageusement SSPE (*Sodium*  
25 *Saline Phosphate EDTA ; Molecular Cloning, A practical guide, Sambrook et al., Vol.3, 1989, annexe B13*) 5 fois concentré, 0,5% Tween 20, Merthiolate 0,01 % ,

- incubation du mélange réactionnel pendant une période suffisamment longue pour permettre l'hybridation ; cette incubation pouvant être, par exemple, avantageusement accomplie à 37°C pendant environ 1 heure,

30 - un ou plusieurs lavage(s) du mélange précédent, afin d'éliminer toute séquence nucléique n'ayant pas réagi ; lesdits lavages pouvant être par exemple effectués avec une solution contenant du Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM et Tween 20 0,1%, pH 7,4.

- révélation des sondes de détection hybridées aux séquences nucléiques amplifiées.

Selon un mode avantageux de l'invention, la sonde de détection est  
5 marquée à la peroxydase, et la révélation de l'activité de la peroxydase liée à la sonde de détection hybridée est réalisée par lecture colorimétrique, en présence d'un substrat chromogène, selon les étapes suivantes :

- dépôt d'une solution contenant un substrat chromogène, tel que le  
tetraméthylbenzidine (TMB ), dans chacun des puits contenant le mélange de la  
10 réaction, et incubation à l'obscurité de la microplaque pendant un temps suffisant, généralement 20 à 30 min., puis la réaction est arrêtée par l'addition d'une solution d'arrêt, ladite solution étant avantageusement une solution de  $H_2SO_4$  utilisée à une concentration finale de 0.5 N,

- détermination de la densité optique, ladite détermination étant réalisée à  
15 une longueur d'onde de 450 nm (référence 620 nm) lorsque le TMB est utilisé comme substrat chromogène.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, la sonde de capture utilisée pour la détection de *E. coli* O157 :H7 peut être SEQ ID N°15 et  
20 la sonde de détection est l'oligonucléotide SEQ ID N°18. De même, la sonde de capture utilisée pour la détection des bactéries EHEC peut être SEQ ID N°25 et la sonde de détection l'oligonucléotide SEQ ID N°27.

L'invention concerne également une trousse de détection, pour  
25 l'identification de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC, contenus dans un échantillon, comprenant parmi les réactifs :

- au moins deux oligonucléotides tels que définis précédemment, utilisés comme amorces pour l'amplification de *E. coli* O157 :H7 ou des bactéries du groupe EHEC,

30 - éventuellement, un composant pour vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement, une sonde nucléique telle que définie précédemment.

Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif pour illustrer l'invention.

### EXEMPLE 1

#### 5 Caractérisation des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2

##### 1) Construction de la banque génomique de *E. coli* O157 :H7 :

L'ADN génomique de la souche *E. coli* O157 :H7 isolée des selles d'un patient atteint de colite hémorragique et productrice des vérotoxines de type 1 et  
10 2 a été digéré partiellement par l'endonucléase *Pst*I (Boehringer Mannheim ; Réf. 621625) en faisant agir 0.03 unité d'enzyme par µg d'ADN en milieu tamponné pendant 1 heure à 37°C. L'ADN génomique ainsi digéré a permis de générer des fragments de 35-45 kb. Le cosmide pH79 (*Hohn et Murray, Proc. Natl. Acad. Sci* 74, 1977, 3259-3263) a été digéré de la même manière et  
15 déphosphorilé pour éviter toute autoligation.

La ligation s'est effectuée en mélangeant 900 ng de vecteur et 2.6 µg de fragments d'ADN de 35-45 kb (soit un rapport molaire vecteur/insert de 2), le milieu réactionnel étant laissé à 14°C pendant 18 heures après avoir été  
20 additionné de 2 unités de T4 DNA ligase (Boehringer Mannheim ; Réf. 481220). Les cosmides recombinants ont été encapsidés *in vitro* et utilisés pour transformer les bactéries *E. coli* XL1-Blue MR (Stratagene ; Réf. 200300). Les bactéries transformées ont été incubées 1 heure à 37°C en milieu LB (*Luria-Bertani, Molecular Cloning, A practical guide, Sambrook et al., Vol.3, 1989, annexe A1*). Les fragments d'ADN de 35-45 kb étant insérés dans le vecteur  
25 pH79 de manière à abolir le site de résistance ampicilline et préserver le site de résistance tétracycline, les bactéries ont été ensuite étalées sur milieu sélectif gélosé contenant 12.5 µg/ml de tétracycline.

30 Des mini-préparations d'ADN cosmique ont été effectuées à partir des 360 premières colonies isolées sur tétracycline en utilisant le Kit REAL Prep96 distribué par Quiagen (Réf. 26171).

L'ADN de ces préparations a été ensuite digéré par les endonucléases *Pst*I, *Eco*RI et *Sal*I (Boehringer Mannheim, Réf. 621625, 703737 et 567663), analysé en électrophorèse sur gel d'agarose à 1.2 % puis transféré sur filtre de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham, Réf. RPN 303B). L'ADN a été fixé de façon  
5 irréversible par 5 mn d'exposition aux UV.

## 2) Criblage de la banque :

Les hybridations ont été réalisées avec une sonde d'ADN homologue provenant de la souche *E. coli* O157:H7 (Collection de l'Institut Pasteur, n°  
10 103571) et avec une sonde d'ADN hétérologue constituée d'un « pool » d'ADN provenant de 8 souches *E. coli* O55:H7 (Collection de l'Institut Pasteur, n° 105215, 105216, 105217, 105228, 105239, 105240, 105241, 105242).

Les différents filtres ont été hybridés pendant 16 à 18 heures à 65°C dans  
15 une solution contenant du tampon SSC (*Sodium Saline Citrate* ; *Molecular Cloning, A practical guide, Sambrook et al., Vol. 3, 1989, annexe B13*) 6 fois concentré, de la solution de Denhart 5 fois concentrée (*Molecular Cloning, Vol. 3, 1989, annexe B15*), 10 % de sulfate dextran (Pharmacia Biotech, Réf. 17-0340-02), 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, 100 µg/ml ADN simple brin de sperme de  
20 saumon et l'ADN relevant (O157:H7).

Après hybridation, les filtres ont été lavés 2 fois 10 mn dans un tampon SSC 2 fois concentré à 65°C, 1 fois 30 mn dans un tampon contenant du SSC 2 fois concentré et 0.1 % SDS à 65°C puis 1 fois 10 mn dans du SSC dilué au  
25 1/10<sup>e</sup> à 65°C. Les filtres encore humides ont été exposés en cassette avec un écran intensifiant pendant 24 à 48 heures à -80°C.

Après le temps d'exposition nécessaire, les films ont été développés puis les membranes de nylon déshybridées en effectuant 4 à 5 cycles de bains à  
30 45°C sous agitation. Pour chaque cycle, 2 bains successifs de 30 mn dans une solution de NaOH 0.5 N puis 30 mn dans un tampon contenant du SSC dilué au 1/10<sup>e</sup> et SDS 0.1 % ont été effectués. Les membranes ont finalement été lavées en SSC 2 fois concentré et mises en cassette pour vérifier qu'il ne reste plus de

traces d'hybridation. Après déshybridation, les filtres ont été hybridés de la même manière que précédemment avec un pool d'ADN non relevant (O55 :H7).

3) Isolement et clonage des fragments SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 :

5 Les résultats de ces hybridations ont permis d'identifier deux clones cosmidiques à partir desquels un fragment d'environ 1 à 2 kb, hybridant avec la sonde homologue et n'hybridant pas avec la sonde hétérologue, a été isolé respectivement. Après avoir vérifié leur conservation chez différentes souches O157 :H7 par hybridation en « dot-blot », ces fragments ont été clonés dans un  
10 vecteur pUC18 (Oncor Appligene, Réf. 161131) puis préparés en grande quantité. Les plasmides recombinants ont été dénommés pDF3 et pDF4 et correspondent respectivement aux séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

4) Détermination des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2

15 Les fragments ont été séquencés selon la méthode de Sanger *et al.* décrite dans *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 1977, 5463, en utilisant le « primer universel » et le « reverse primer » du plasmide pUC18, ainsi que des oligonucléotides internes aux séquences.

20 La séquence SEQ ID N°1 (Figure 1), contenant 1489 pb, présente une homologie de 99,9 % avec le gène *katP* de *E. coli* O157 :H7 dans la région 407 à 1489 et une homologie de 95,8 % avec l'IS91 de *E. coli* dans la région 1 à 406.

25 L'analyse de la séquence SEQ ID N°2 (Figure 2), contenant 1181 pb, ne révèle aucune séquence connue du plasmide entérohémolytique. Seule la partie 237 à 570 présente une homologie de 68 % avec le gène plasmidique *virK*, codant pour une protéine de virulence de *Shigella flexneri*.



## EXEMPLE 2

### Détection spécifique de *E. coli* O157 :H7

L'étude de spécificité a été effectuée sur 100 souches de *E. coli* de  
5 sérotypes différents et 42 souches non *E. coli* comprenant, entre autres, des  
bactéries susceptibles de présenter des réactions croisées avec *E. coli*  
O157 :H7 comme par exemple *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter*  
*freundii*, *Hafnia alvei*, *Escherichia hermanii*.

#### 10 1) Extraction de l'ADN :

On obtient les séquences d'ADN par la méthode d'ébullition en présence  
de Chelex (InstaGene™ Matrix, Biorad). Les échantillons ont été préparés selon  
le protocole suivant :

15 Une suspension bactérienne est effectuée dans de l'eau ultra pure stérile  
à partir de plusieurs colonies bactériennes isolées sur gélose Tryptone-Caséine-  
Soja (Sanofi Diagnostics Pasteur, Réf. 53455), puis centrifugée à 10000-12000  
tours / min pendant 2-3 min et le surnageant soigneusement éliminé. Le culot  
bactérien est resuspendu dans 200 µl de réactif de lyse, homogénéisé puis  
20 incubé dans un bloc chauffant à 100°C pendant 10-15 min. L'échantillon est de  
nouveau homogénéisé, puis centrifugé à 10000-12000 tours / min pendant 2-3  
min. L'ADN peut être amplifié directement ou stocké à -20°C.

#### 2) Amplification par PCR :

25 La réaction d'amplification est réalisée dans un volume total de 50 µl  
contenant 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 0,01% gélatine; 3 mM MgCl<sub>2</sub>;  
0,25 µM de chaque amorce SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 ; 100 µM (dATP, dCTP,  
dGTP) ; 400 µM dUTP ; 0,5 unité d'Uracyl-DNA-Glycosylase (UDG ; BRL Life  
Technologies) ; 1 unité de Taq DNA Polymérase (BRL Life Technologies) et 5 µl  
30 d'ADN préparé comme indiqué dans le paragraphe 1.

Après une incubation à 50°C pendant 2 min puis à 95°C pendant 5 min,  
les échantillons sont soumis à 35 cycles d'amplification composés de 15 sec à

95°C, 15 sec à 65 °C et 15 sec à 72°C. Les tubes sont maintenus à 72°C jusqu'au retrait du plateau.

Les cycles thermiques sont réalisés dans un thermocycleur « Perkin-Elmer 9600 ».

5 Chaque expérience comprend un contrôle positif et un contrôle négatif.

### 3) Visualisation des produits amplifiés :

Les réactions d'amplification sont visualisées sur gel d'agarose ou détectées sur microplaque.

#### 10 3-1) Gel d'agarose :

Après amplification, 50 µl de chloroforme sont ajoutés à chaque échantillon afin d'inactiver l'UDG puis une aliquote de chaque réaction est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % coloré au bromure d'éthidium, en présence d'un marqueur de taille. La visualisation d'un fragment  
15 d'ADN à 676 pb indique la présence de *E. coli* O157 :H7 dans l'échantillon testé.

#### 3-2) Hybridation en microplaque :

Les produits d'amplification sont dénaturés par addition volume à volume d'une solution contenant 200 mM NaOH, 40 mM EDTA. La microplaque dont la  
20 surface des puits est revêtue de la sonde de capture SEQ ID N°15 est préhybridée dans un tampon d'hybridation contenant du SSPE 5 fois concentré, 0,5 % Tween 20 et 0,01 % Merthiolate. Puis la microplaque est vidée et chacune des cupules reçoit 200 µl de tampon d'hybridation contenant le fragment amplifié dénaturé et la sonde de révélation SEQ ID N°18. L'incubation est effectuée à  
25 37°C sous agitation pendant 1 heure.

Les cupules sont ensuite lavées six fois avec 400 µl de solution (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 300 mM NaCl et 0,1% Tween 20), puis l'activité de la  
30 peroxydase liée à la sonde est détectée en ajoutant dans chaque cupule 200 µl d'une solution de détection contenant le chromogène tétraméthylbenzidine (TMB). La microplaque est incubée à 37°C dans l'obscurité pendant 30 min puis 100 µl d'une solution de 1,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont ajoutés pour bloquer les réactions. Les densités optiques sont déterminées à 450 nm contre une référence à 620 nm.

4) Etude de la spécificité :

Les tests ont été effectués sur un total de 142 souches bactériennes, utilisant le couple d'amorces SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 pour l'étape d'amplification par PCR, la sonde de capture SEQ ID N°15 et la sonde de  
5 détection SEQ ID N°18 pour l'étape d'hybridation sur microplaque. —

Les résultats obtenus sur microplaque avec les souches *E. coli* et non *E. coli* (bactéries de genres et espèces différents) sont présentés respectivement  
10 dans les Tableaux I et II ci-dessous :

Tableau I

Souche E. coli (sérotype)	Nombre de souches testées	PCR SEQ ID N° 5 / 6
<b>VTEC/EHEC</b>		
O157:H7	55	+
O157:H-	1	+
O26:H11	10	-
O111:H-	2	-
O145:H-	2	-
O103:H2	2	-
O121:H19	1	-
O165:H25	1	-
O45:H2	1	-
O22:H8	2	-
O137:H41	1	-
O91:H21	1	-
O141:H4	1	-
<b>EPEC</b>		
O55:H7	8	-
O55:H6	1	-
O55:H-	1	-
O111:H-	1	-
O111:H2	1	-
O111:H12	1	-
O128:H2	1	-
O127:H6	1	-
<b>ETEC</b>		
O157:H19	1	-
O159:H34	1	-
CIP 81.86	1	-
<b>E. coli</b>		
CIP 76.24	1	-
CIP 54.8	1	-

Les résultats (+) correspondent à  $DO_{450} > 2,5$ .

Les résultats (-) correspondent à  $DO_{450} < 0,05$ .

Tableau II

Souche ( spèce bactérienn )	Nombre de souches testées	PCR SEQ ID N° 5 / 6
<b>Salmonella</b> Salmonella (groupes I à VI)	10	-
<b>Shigella</b> Shigella flexneri Shigella dysenteriae Shigella sonnei	2 1 1	- - -
<b>Autres</b> Escherichia hermanii Citrobacter freundii Yersinia enterocolitica Yersinia pseudotuberculosis Hafnia alvei Proteus mirabilis Proteus vulgaris Serratia marcescens Klebsiella pneumoniae Klebsiella oxytoca Enterobacter cloacae Enterobacter aerogenes Enterobacter agglomerans Bacillus subtilis Morganella morganii Providencia alcalifaciens Vibrio parahaemolyticus Acinetobacter baumannii Shewanella putrefaciens Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas fluorescens Listeria monocytogenes	2 2 2 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 3	- -

Les résultats (+) correspondent à  $DO_{450} > 2,5$ .

Les résultats (-) correspondent à  $DO_{450} < 0,05$ .

5

En conclusion, seules les souches O157 :H7 et O157 :H- sont détectées sur microplaque avec le système susmentionné.

### EXEMPLE 3

#### Détection spécifique des EHEC

La spécificité a été testée sur un total de 142 souches bactériennes incluant différents sérotypes de *E. coli* ainsi que d'autres espèces bactériennes  
5 pouvant interférer avec la détection des EHEC.

Les ADN ont été extraits selon le protocole décrit dans le premier paragraphe de l'exemple 2.

Les conditions d'amplification sont les suivantes :

10 La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µl contenant 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM de chaque amorce SEQ ID N°21 et SEQ ID N°22 ; 200 µM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ; 1 unité de Taq DNA Polymérase (BRL Life Technologies) et 5 µl d'ADN préparé comme indiqué dans le paragraphe 1 de l'exemple 2.

15

Les cycles thermiques sont réalisés dans un thermocycleur « Perkin-Elmer 9600 ».

Chaque expérience comprend un contrôle positif et un contrôle négatif.

20

Les produits d'amplification ont été visualisés sur gel d'agarose coloré au BET, la présence d'une bande à 382 pb témoignant de la présence d'EHEC dans l'échantillon testé.

Les résultats sont présentés dans le Tableau III.

25

Seules les souches présentant les caractères *ehly* et *eae*, facteurs de virulence fréquemment associés chez les souches isolées d'infections humaines, sont détectées par PCR avec le couple d'amorces SEQ ID N°21 et SEQ ID N°22.

30

De plus, l'utilisation dudit couple d'amorces permet également de détecter en particulier, grâce à une réaction d'amplification unique, les souches de *E. coli* possédant le génotype (*vt*<sup>+</sup>, *eae*<sup>+</sup> et *ehly*<sup>+</sup>), caractéristique des *E. coli* entérohémorragiques.

Tableau III

Souche (sérotype)	Nombre de souches testées	Génotype	PCR SEQ ID N°21/22
<b>VTEC/EHEC</b>			
O157:H7	54	vt+ , ehly+ , eae+	+
	1	vt- , ehly+ , eae+	+
O157:H-	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O26:H11	5	vt+ , ehly+ , eae+	+
	1	vt- , ehly+ , eae+	+
O26:H-	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O111:H-	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O145:H-	2	vt+ , ehly+ , eae+	+
O103:H2	2	vt+ , ehly+ , eae+	+
O121:H19	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O165:H25	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O45:H2	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O22:H8	2	vt+ , ehly+ , eae-	-
O137:H41	1	vt+ , ehly+ , eae-	-
O91:H21	1	vt+ , ehly+ , eae-	-
O26:H11	3	vt+ , ehly- , eae+	-
O111:H-	1	vt+ , ehly- , eae+	-
O141:H4	1	vt+ , ehly- , eae-	-
<b>EPEC</b>			
O55:H7	8	vt- , ehly- , eae+	-
O55:H6	1	vt- , ehly- , eae-	-
O55:H-	1	vt- , ehly- , eae-	-
O111:H-	1	vt- , ehly- , eae-	-
O111:H2	1	vt- , ehly- , eae+	-
O111:H12	1	vt- , ehly- , eae-	-
O128:H2	1	vt- , ehly- , eae+	-
O127:H6	1	vt- , ehly- , eae+	-
<b>ETEC</b>			
O157:H19	1	vt- , ehly- , eae-	-
O159:H34	1	vt- , ehly- , eae-	-
CIP 81.86	1	vt- , ehly- , eae-	-
<b>E. coli</b>			
CIP 76.24	1	vt- , ehly- , eae-	-
CIP 54.8	1	vt- , ehly- , eae-	-
<b>Non E. coli</b>	42		-

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE

5

(i) DEPOSANT :

(A) NOM : PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS

(B) RUE : 3 BOULEVARD RAYMOND POINCARE

(C) VILLE : MARNES LA COQUETTE

(D) PAYS : FRANCE

10

(E) CODE POSTAL : 92430

(ii) TITRE DE L'INVENTION : SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA DETECTION  
DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 27

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°1 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

20

(A) LONGUEUR : 1489 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : double

(D) CONFIGURATION : linéaire

(E) BRIN : sens

25

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°1 :

30

1 CTGCAGTCCG GAGATGAAAG CACCACTGTG TGTACCCCAT CAGCGTGGTC

51 CCGCAGGCCA TGATTTTGTG CACAGACTCA ATGACTACCG GACGCACTGA

101 ACCTTCCGGT TGTTTCTCCA GCCAGTTAAG CCAGCGGTTT CCCTGCTGAA

35

151 AAATGTCGGC AAAACGGGGA AGCATCAGAA GGGCGGGGGA ACTCCGTCCG

201 GCCAGTGAAC CGTGCCACAC TCCGGGCAGT ACATGCCGCC GGCGCTGATA

40

251 CCGGCAAGAA TGGTCGCAAA CTCCCGCTCC GTGCAGCGGG CTATTTTCAGG

301 ATACCCTTCG TCATCAACAC GTACAAACCA GAAGACCAGC TTTTGTGTTT

351 TGACATCCAC AAAGAAGGGA ATATTCAGGT CTGCGCAGCA CTCAACGGCA

45

401 TCGTCAGTTG CGGCTTGGA CCCCTTAGTA TTTTGTGCT GTAGTATCTA

451 TCCCAGCAAT AGGTATATCC TGTTGCATCA ATAAAGTTGA CTTTGTGATA



	501	CAACATGCGA	ATTTCCCTTA	ATCCGGAGCT	ATTCGTATGA	TAAAAAAAAC
	551	TCTTCCTGTT	CTGATTCTTC	TGGCGCTATC	GGGGAGCTTT	TCTACCGCTG
5	601	TAGCCGCTGA	TAAAAAAGAG	ACTCAAAT	TCTACTATCC	AGAAACACTG
	651	GATTTAACTC	CTCTGAGATT	ACACAGCCCT	GAATCAAATC	CCTGGGGGGC
10	701	TGATTTTGAT	TATGCCACCA	GATTTCAACA	GCTGGATATG	GAGGCTCTGA
	751	AAAAAGATAT	CAAAGATTTG	CTGACAACTT	CCCAGGATTG	GTGCCCTGCG
	801	GATTATGGTC	ATTATGGTCC	TTTCTTTATT	CGTATGGCTT	GGCACGGTGC
15	851	CGGAACATAC	AGGACATATG	ATGGCCGGGG	AGGCGCCAGT	GGTGGTCAGC
	901	AACGTTTTGA	ACCGCTGAAC	AGCTGGCCGG	ATAACGTAA	TCTGGATAAA
20	951	GCCCGTCGAT	TGCTGTGGCC	AGTCAAGAAA	AAATACGGCT	CCAGTATTTT
	1001	CTGGGGAGAC	CTGATGGTCC	TGACTGGTAA	TGTTGCCCTT	GAATCCATGG
	1051	GATTTAAAAC	GCTGGGATTT	GCTGGCGGAA	GAGAAGATGA	CTGGGAGTCG
25	1101	GACCTGGTAT	ACTGGGGGCC	TGACAACAAG	CCTCTGTCAG	ATAACCGGGA
	1151	TAAAAACGGG	AAACTTCAGA	AACCTCTTGC	CGCCACGCAG	ATGGGACTTA
30	1201	TTTATGTCAA	TCCTGAAGGC	CCCGGTGGAA	AACCAGATCC	TCTGGCTTCC
	1251	GCGAAAGATA	TCAGGGAAGC	TTTTTCACGT	ATGGCCATGG	ATGATGAGGA
	1301	GACTGTGGCC	CTGATCGCGG	GAGGGCATA	ATTTGGTAAA	GCACATGGTG
35	1351	CAGCGTCTCC	TGAAAAATGT	ATTGGCGCAG	GGCCTGATGG	TGCACCTGTG
	1401	GAGGAGCAGG	GACTGGGATG	GAAAAATAAA	TGTGGTACAG	GAAACGGCAA
40	1451	ATATACCATC	ACCAGTGGCC	TGGAAGGAGC	CTGGTCGAC	

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°2 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- 45 (A) LONGUEUR : 1181 paires de bases  
 (B) TYPE : acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS : double  
 (D) CONFIGURATION : linéaire  
 (E) BRIN : sens

50 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°2 :

55	1	CTGCAGGAGA	TGGAAAAAAA	GCCAAAATAA	AAAATTGCCC	ATCCCAGCGC
	51	GCTCCAGCTG	AAAGTAGGCC	TGTTCTGTCC	GGTATTTAAA	TGCATTGACC

	101	GTCCCCGTAT	TTAAACAATG	TGATAAATTA	CTCCGTTACC	GGAAAACCGC
5	151	TGAACAAAAT	TCGGGCTGAA	AAGAGGATCC	GCCGTTATCT	GTTGCATTTT
	201	CCCTTAGCCT	GACTAGCCAG	AGACACAATG	ATCTGTGCCG	TTCTGTTAAT
	251	ATCAAACCGG	TACTCAATAT	CTTCTCTGGC	GCTGGCTGCC	ATCATCCGGA
10	301	AGCGTTCCGG	TCGGGATAAA	AAATCGCGCA	GTGCGCCGGT	CCATGCAGAC
	351	ACATCCCCCA	CGGGTAACAG	CGTCCCTGTC	ACATTCTTCT	GAATGACATC
15	401	AGGGATCCCG	CCCGTCTCAC	TGGCGATAAC	GGGCACGCCG	GAGACTGACG
	451	CTTCAGCCAG	TACCATACCA	AACGCTTCAT	TTTCCGAAGG	CATGACCACC
	501	AACTGGCAA	TCCGGTAGAC	CGGTAACGCT	GGGAAAAGGG	CACCTGCCAT
20	551	TAACACATCT	CCGCTCATTC	CCAGGTGTTC	TGTCTGCTGA	CGCAGACGTG
	601	CTTCGTATTC	TTCACGCCCC	GCGCCCACCA	CGAGCCAGCG	AAATGATTTT
25	651	CCTTCCATCT	TCAGCTGATA	CAATACACGC	AGCATAAATT	CATGTCTTTT
	701	TTCGGGACGT	AGCATCCCCA	CCTGAACGAT	AAGCGGAACA	TTGTCTGCTG
	751	ATGCAGCCCA	GGCGTGGATA	TGCAGGGGTA	ACGGTCGCAT	GGCTTCATTA
30	801	TGCAATGCGG	GCCAGTCGAA	ACCCGGTGGA	ATAACCGTTA	CCGGTGTCTT
	851	GACACCTTCC	GCCATCAGAT	GCGCCATCAT	GGGTGAGATA	GGCACAACAA
35	901	TGAAATCACA	CAGATAATTC	AGGGAAAACG	TTCTGGTCTT	ACGGGTGATG
	951	TAGGTTTTTT	GTCTGACAAT	AGTGAAGCGG	TGACAGCATA	TCAGACGGCT
	1001	CAGTCTGCT	ATATTACTGT	CATGGCCACT	ATGGCAGATG	ACCAGATCAG
40	1051	GTTTAAATTC	CCCGATAATC	CGTCGAAGTC	TGAGGATGGA	AGGAAGGTGA
	1101	AGGCTGTTCC	TGAAAGGAAT	AAAAGTGACA	TCATGCCCTC	TTTTTCTGGC
45	1151	TTCCGGAGCA	ATTTTACTTT	TTTCTCTGCA	G	

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°3 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- 50 (A) LONGUEUR : 22 paires de bases  
 (B) TYPE : acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS : simple  
 (D) CONFIGURATION : linéaire  
 (E) BRIN : sens

55 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°3 :  
CGGAGATGAAAGCACCCTGTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°4 :

- 5 (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
  - (B) TYPE : acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
  - (D) CONFIGURATION : linéaire
  - 10 (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°4 :  
15 GGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°5 :

- (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 25 paires de bases
  - 20 (B) TYPE : acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
  - (D) CONFIGURATION : linéaire
  - (E) BRIN : sens

25 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°5 :  
GTCCGGAGATGAAAGCACCCTGTG

30 (2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°6 :

- (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 25 paires de bases
  - (B) TYPE : acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
  - 35 (D) CONFIGURATION : linéaire
  - (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

40 (iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°6 :  
TCAGGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°7 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

5

(A) LONGUEUR : 23 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : simple

(D) CONFIGURATION : linéaire

(E) BRIN : sens

10

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°7 :

GGCGCTGATACCGCAAGAATGG

15

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°8 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 23 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : simple

20

(D) CONFIGURATION : linéaire

(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

25

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°8 :

GGTCCCGCAGGCCATGATTTTGG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°9 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

30

(A) LONGUEUR : 24 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : simple

(D) CONFIGURATION : linéaire

35

(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°9 :

CCGGCAAGAATGGTCGAAACTCC

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°10 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 26 paires de bases  
(B) TYPE : acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS : simple  
(D) CONFIGURATION : linéaire  
(E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

10

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°10 :

AAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACGA

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°11 :

15 (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 26 paires de bases  
(B) TYPE : acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS : simple  
(D) CONFIGURATION : linéaire  
20 (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°11 :

25 TAAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°12 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- 30 (A) LONGUEUR : 31 paires de bases  
(B) TYPE : acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS : simple  
(D) CONFIGURATION : linéaire  
(E) BRIN : sens

35 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°12 :

CTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTGGAAC

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°13 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°13 :

AGCACTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°14 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°14 :

CTATTTTCAGGATACCCTTCGTCATCAACACG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°15 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°15 :

AATTTCCCTTAATCCGGAGCTATTCGTATGA

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°16 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- 5 (A) LONGUEUR : 20 paires de bases  
(B) TYPE : acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS : simple  
(D) CONFIGURATION : linéaire  
(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

10

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°16 :

GAAGACCAGCTTTTGTTC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°17 :

15 (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 20 paires de bases  
(B) TYPE : acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS : simple  
(D) CONFIGURATION : linéaire  
20 (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°17 :

25 TGTCACAGACTCAATGACTA

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°18 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- 30 (A) LONGUEUR : 14 paires de bases  
(B) TYPE : acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS : simple  
(D) CONFIGURATION : linéaire  
(E) BRIN : sens

35 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°18 :

GGCATCGTCAGTTG

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°19 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 16 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

5

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

10

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°19 :

CGGCATCGTCAGTTGC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°20 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 18 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

15

20

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°20 :

25 ACGGCATCGTCAGTTGCG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°21 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

30

35

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°21 :

CCACCTGAACGATAAGCGGAAC

40



(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°22 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- 5 (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

10

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°22 :

CACCTTCCTTCCATCCTCAGAC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°23 :

15 (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 20 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- 20 (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°23 :

25 ATCCCAGCGCGCTCCAGCTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°24 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
- 30 (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : antisens

35 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°24 :

ACCCATGATGGCGCATCTGATG

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°25 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- 5 (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

10

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°25 :

ACGTTCTGGTCTTACGGGTGATGTAGGTTTT

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°26 :

15

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- 20 (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°26 :

25 TAGTGAAGCGGTGACAGCATATCAGACGGCT

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°27 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 21 paires de bases
- 30 (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

35

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°27 :

GTGAGATAGGCACAACAATGA

## REVENDECATIONS

1. Séquence nucléotidique isolée comprenant la séquence nucléique SEQ ID N°1 ou la séquence nucléique SEQ ID N°2, leurs séquences complémentaires, les fragments et séquences dérivées de celles-ci, différant par mutation, insertion, délétion et/ou substitution d'une ou plusieurs bases et s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec les séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, respectivement.  
10
2. Séquence nucléotidique isolée comprenant la séquence SEQ ID N°1, les séquences complémentaires de celles-ci et les séquences dérivées de celle-ci, comprenant un enchaînement nucléotidique résultant de l'association stable d'au moins une partie de la séquence d'insertion /S91 et au moins une partie de la  
15 séquence du gène *katP*.
3. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 2, comprenant au moins 8, avantageusement 10, de préférence 14 nucléotides consécutifs de l'enchaînement de la séquence SEQ ID N°1, incluant les nucléotides de la  
20 position 400 à 407.
4. Séquence nucléotidique isolée comprenant au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 ou de la séquence SEQ ID N°2, ou de séquences complémentaires et dérivées de celles-ci, telles que définies à la  
25 revendication 1.
5. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 4, choisie parmi les séquences nucléiques suivantes :  
SEQ ID N°3 : 5' - CGGAGATGAAAGCACCACTGTG - 3'  
30 SEQ ID N°4 : 5' - GGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG - 3'  
SEQ ID N°5 : 5' - GTCCGGAGATGAAAGCACCACTGTG - 3'  
SEQ ID N°6 : 5' - TCAGGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG - 3'  
SEQ ID N°7 : 5' - GGCGCTGATACCGGCAAGAATGG - 3'

- SEQ ID N°8 : 5' - GGTCCCGCAGGCCATGATTTTTG - 3'  
SEQ ID N°9 : 5' - CCGGCAAGAATGGTCGCAAACTCC - 3'  
SEQ ID N°10 : 5' - AAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACGA - 3'  
SEQ ID N°11 : 5' - TAAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACG - 3'  
5 SEQ ID N°12 : 5' - CTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTGGAAC - 3'  
SEQ ID N°13 : 5' - AGCACTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTG - 3'  
SEQ ID N°14 : 5' - CTATTTTCAGGATACCCTTCGTCATCAACACG - 3'  
SEQ ID N°15 : 5' - AATTTCCCTTAATCCGGAGCTATTCGTATGA - 3'  
SEQ ID N°16 : 5' - GAAGACCAGCTTTTTGTTTC - 3'  
10 SEQ ID N°17 : 5' - TGTCACAGACTCAATGACTA - 3'  
SEQ ID N°18 : 5' - GGCATCGTCAGTTG - 3'  
SEQ ID N°19 : 5' - CGGCATCGTCAGTTGC - 3'  
SEQ ID N°20 : 5' - ACGGCATCGTCAGTTGCG - 3'  
SEQ ID N°21 : 5' - CCACCTGAACGATAAGCGGAAC - 3'  
15 SEQ ID N°22 : 5' - CACCTTCCTTCCATCCTCAGAC - 3'  
SEQ ID N°23 : 5' - ATCCCAGCGCGCTCCAGCTG - 3'  
SEQ ID N°24 : 5' - ACCCATGATGGCGCATCTGATG - 3'  
SEQ ID N°25 : 5' - ACGTTCTGGTCTTACGGGTGATGTAGGTTTT - 3'  
SEQ ID N°26 : 5' - TAGTGAAGCGGTGACAGCATATCAGACGGCT - 3'  
20 SEQ ID N°27 : 5' - GTGAGATAGGCACAACAATGA - 3'

6. Couples de séquences nucléotidiques isolées selon les revendications 4 ou 5, utilisés comme amorces, choisis parmi des couples suivants de séquences suivantes :

- 25 - SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4  
- SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6  
- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7  
- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 8  
- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 9  
30 - SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22  
- SEQ ID N° 23 et SEQ ID N° 24

7. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 4 ou 5, utilisée comme sonde, choisie parmi les séquences suivantes :

SEQ ID N°14 , SEQ ID N°25, SEQ ID N°15 , SEQ ID N°26, SEQ ID N°18 , et SEQ ID N°27

5

8. ~~Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est marquée.~~

9. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est immobilisée sur un support.

10

10. Plasmides pDF3 et pDF4 déposés à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes respectivement sous les numéros I-1999 et I-2000, le 26 mars 1998.

15

11. Cellule hôte comprenant un plasmide selon la revendication 10.

12. Procédé de détection de *E. coli* O157:H7 ou des EHEC dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

20

(a) mise en contact de l'échantillon avec un couple d'amorces oligonucléotiques choisi parmi les oligonucléotides définis à la revendication 5 ; l'acide nucléique contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, rendu accessible aux dites amorces à la cible recherchée,

25

(b) amplification de la séquence nucléique encadrée par le couple d'amorces choisi,

(c) vérification de la présence du produit amplifié par utilisation d'au moins une sonde spécifique du produit amplifié.

13. Procédé selon la revendication 12, selon lequel l'étape (c) comprend les sous-étapes suivantes :

30

(c<sub>1</sub>) dénaturation des séquences amplifiées par un moyen physique ou chimique,

(c<sub>2</sub>) mise en contact avec une solution contenant les fragments amplifiés dénaturés de l'étape (c<sub>1</sub>) avec, d'une part, au moins une sonde de capture, et d'autre part, au moins une sonde de détection, éventuellement marquée, les sondes de capture et de détection ayant une séquence telle que définie à la revendication 1, et susceptibles de s'hybrider avec le même brin des fragments amplifiés, ladite mise en contact étant réalisée pendant un temps suffisant pour permettre la réaction d'hybridation,

(c<sub>3</sub>) au moins un lavage pour éliminer les séquences nucléiques n'ayant pas réagi,

(c<sub>4</sub>) révélation des sondes de détection hybridées aux séquences nucléiques amplifiées.

14. Procédé selon les revendications 12 ou 13, dans lequel la sonde de capture est fixée à la surface d'un puits d'une plaque de microtitration.

15. Procédé selon les revendications 12 ou 13, dans lequel la sonde de détection est marquée à la peroxydase.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que la mise en évidence de l'activité de la peroxydase liée à la sonde de détection ayant réagi, s'effectue par réaction colorimétrique, en présence d'un substrat chromogène, tel que le tétraméthylbenzidine (TMB), par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- addition du substrat chromogène, tel qu'une solution de TMB dans les puits contenant le mélange réactionnel,
- incubation, à l'obscurité, pendant un temps suffisant pour permettre le développement de la coloration,
- blocage de la réaction par addition d'une solution d'arrêt,
- détermination de la densité optique à une longueur d'onde appropriée.

17. Procédé de détection de *E. coli* O157:H7, selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, mettant en œuvre les oligonucléotides suivants :

- les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N° 6, comme amorces pour l'amplification,
- la séquence SEQ ID N° 15, comme sonde de capture,
- la séquence SEQ ID N° 18, comme sonde de détection.

5

18. Procédé de détection des EHEC, selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, mettant en œuvre les oligonucléotides suivants :

- les séquences SEQ ID N°21 et SEQ ID N° 22, comme amorces pour l'amplification,
- 10 - la séquence SEQ ID N° 25, comme sonde de capture,
- la séquence SEQ ID N° 27, comme sonde de détection.

19. Trousse pour la détection de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC, comprenant parmi les réactifs :

- 15 - au moins deux oligonucléotides selon la revendication 5, utilisés comme couple d'amorces,
- éventuellement au moins une sonde oligonucléotidique selon la revendication 5, pour la détection du produit amplifié.

20

## REVENDEICATIONS

1. Séquence nucléotidique isolée comprenant la séquence nucléique SEQ ID N°1, ses séquences complémentaires, les fragments et séquences dérivées de celle-ci, différant par mutation, insertion, délétion et/ou substitution d'une ou plusieurs bases et s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence SEQ ID N°1.
2. Séquence nucléotidique isolée comprenant la séquence SEQ ID N°1, les séquences complémentaires de celles-ci et les séquences dérivées de celle-ci, comprenant un enchaînement nucléotidique résultant de l'association stable d'au moins une partie de la séquence d'insertion /S91 et au moins une partie de la séquence du gène *katP*.
3. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 2, comprenant au moins 8, avantageusement 10, de préférence 14 nucléotides consécutifs de l'enchaînement de la séquence SEQ ID N°1, incluant les nucléotides de la position 400 à 407.
4. Séquence nucléotidique isolée comprenant au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, ou de séquences complémentaires et dérivées de celle-ci, telles que définies à la revendication 1.
5. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 4, choisie parmi les séquences nucléiques suivantes :
- SEQ ID N°3 : 5' - CGGAGATGAAAGCACCACTGTG - 3'
- SEQ ID N°4 : 5' - GGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG - 3'
- SEQ ID N°5 : 5' - GTCCGGAGATGAAAGCACCACTGTG - 3'
- SEQ ID N°6 : 5' - TCAGGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG - 3'
- SEQ ID N°7 : 5' - GGCGCTGATACCGGCAAGAATGG - 3'
- SEQ ID N°8 : 5' - GGTCCCGCAGGCCATGATTTTGTG - 3'
- SEQ ID N°9 : 5' - CCGGCAAGAATGGTCGCAAACCTCC - 3'



SEQ ID N°10 :5' - AAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACGA - 3'

SEQ ID N°11 :5' - TAAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACG - 3'

SEQ ID N°12 :5' - CTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTGGAAC - 3'

SEQ ID N°13 :5' - AGCACTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTG - 3'

5 SEQ ID N°14 :5' - CTATTTCAAGGATACCCTTCGTCATCAACACG - 3'

SEQ ID N°15 :5' - AATTTCCCTTAATCCGGAGCTATTCGTATGA - 3'

SEQ ID N°16 :5' - GAAGACCAGCTTTTTGTTTC - 3'

SEQ ID N°17 :5' - TGTCACAGACTCAATGACTA - 3'

SEQ ID N°18 :5' - GGCATCGTCAGTTG - 3'

10 SEQ ID N°19 :5' - CGGCATCGTCAGTTGC - 3'

SEQ ID N°20 :5' - ACGGCATCGTCAGTTGCG - 3'

6. Couples de séquences nucléotidiques isolées selon les revendications 4 ou 5, utilisés comme amorces, choisis parmi des couples suivants de séquences  
15 suivantes :

- SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4

- SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6

- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7

- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 8

20 - SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 9

7. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 4 ou 5, utilisée comme sonde, choisie parmi les séquences suivantes :

SEQ ID N°14 , SEQ ID N°15 et SEQ ID N°18.

25

8. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est marquée.

9. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 7, caractérisée en  
30 ce qu'elle est immobilisée sur un support.

10. Plasmide pDF3 déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le numéro I-1999 le 26 mars 1998.

11. Cellule hôte comprenant le plasmide selon la revendication 10.

12. Procédé de détection de *E. coli* O157:H7 ou des EHEC dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

(a) mise en contact de l'échantillon avec un couple d'amorces oligonucléotiques choisi parmi les oligonucléotides définis à la revendication 5 ; l'acide nucléique contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, rendu accessible aux dites amorces à la cible recherchée,

(b) amplification de la séquence nucléique encadrée par le couple d'amorces choisi,

(c) vérification de la présence du produit amplifié par utilisation d'au moins une sonde spécifique du produit amplifié.

13. Procédé selon la revendication 12, selon lequel l'étape (c) comprend les sous-étapes suivantes :

(c<sub>1</sub>) dénaturation des séquences amplifiées par un moyen physique ou chimique,

(c<sub>2</sub>) mise en contact avec une solution contenant les fragments amplifiés dénaturés de l'étape (c<sub>1</sub>) avec, d'une part, au moins une sonde de capture, et d'autre part, au moins une sonde de détection, éventuellement marquée, les sondes de capture et de détection ayant une séquence telle que définie à la revendication 1, et susceptibles de s'hybrider avec le même brin des fragments amplifiés, ladite mise en contact étant réalisée pendant un temps suffisant pour permettre la réaction d'hybridation,

(c<sub>3</sub>) au moins un lavage pour éliminer les séquences nucléiques n'ayant pas réagi,

(c<sub>4</sub>) révélation des sondes de détection hybridées aux séquences nucléiques amplifiées.

14. Procédé selon les revendications 12 ou 13, dans lequel la sonde de capture est fixée à la surface d'un puits d'une plaque de microtitration.

15. Procédé selon les revendications 12 ou 13, dans lequel la sonde de détection est marquée à la peroxydase.

5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que la mise en évidence de l'activité de la peroxydase liée à la sonde de détection ayant réagi, s'effectue par réaction colorimétrique, en présence d'un substrat chromogène, tel que le tétraméthylbenzidine (TMB), par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 10 - addition du substrat chromogène, tel qu'une solution de TMB dans les puits contenant le mélange réactionnel,
- incubation, à l'obscurité, pendant un temps suffisant pour permettre le développement de la coloration,
- blocage de la réaction par addition d'une solution d'arrêt,
- détermination de la densité optique à une longueur d'onde appropriée.

15

17. Procédé de détection de *E. coli* O157 :H7, selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, mettant en œuvre les oligonucléotides suivants :

- les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N° 6, comme amorces pour l'amplification,
- 20 - la séquence SEQ ID N° 15, comme sonde de capture,
- la séquence SEQ ID N° 18, comme sonde de détection.

18. Trousse pour la détection de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC, comprenant parmi les réactifs :

- 25 - au moins deux oligonucléotides selon la revendication 5, utilisés comme couple d'amorces,
- éventuellement au moins une sonde oligonucléotidique selon la revendication 5, pour la détection du produit amplifié.

30

1/2

1	CTGCAGTCCG	GAGATGAAAG	CACCACTGTG	TGTACCCCAT	CAGCGTGGTC
51	CCGCAGGCCA	TGATTTTTGT	CACAGACTCA	ATGACTACCG	GACGCACTGA
101	ACCTTCCGGT	TGTTTCTCCA	GCCAGTTAAG	CCAGCGGTTT	CCCTGCTGAA
151	AAATGTCGGC	AAAACGGGGA	AGCATCAGAA	GGGCGGGGGA	ACTCCGTCCG
201	GCCAGTGAAC	CGTGCCACAC	TCCGGGCAGT	ACATGCCGCC	GGCGCTGATA
251	CCGGCAAGAA	TGGTCGAAA	CTCCCCTCC	GTGCAGCGGG	CTATTTTCAGG
301	ATACCCCTTCG	TCATCAACAC	GTACAAACCA	GAAGACCAGC	TTTTTGT TTC
351	TGACATCCAC	AAAGAAGGGA	ATATTCAGGT	CTGCGCAGCA	CTCAACGGCA
IS91	← katP →				
401	TCGTCAGTTG	CGGCTTGGAA	CCCCTTAGTA	TTTTTTGTCT	GTAGTATCTA
451	TCCCAGCAAT	AGGTATATCC	TGTTGCATCA	ATAAAGTTGA	CTTTTGTATA
501	CAACATGCGA	ATTTCCTTA	ATCCGGAGCT	ATTCGTATGA	TAAAAAAAAC
551	TCTTCCTGTT	CTGATTCTTC	TGGCGCTATC	GGGGAGCTTT	TCTACCGCTG
601	TAGCCGCTGA	TAAAAAAGAG	ACTCAAATT	TCTACTATCC	AGAAACACTG
651	GATTTAACTC	CTCTGAGATT	ACACAGCCCT	GAATCAAATC	CCTGGGGGGC
701	TGATTTTGAT	TATGCCACCA	GATTTCAACA	GCTGGATATG	GAGGCTCTGA
751	AAAAAGATAT	CAAAGATTTG	CTGACAACCT	CCCAGGATTG	GTGCCCTGCG
801	GATTATGGTC	ATTATGGTCC	TTTCTTTATT	CGTATGGCTT	GGCACGGTGC
851	CGGAACATAC	AGGACATATG	ATGGCCGGGG	AGGCGCCAGT	GGTGGTCAGC
901	AACGTTTTGA	ACCGCTGAAC	AGCTGGCCGG	ATAACGT TAA	TCTGGATAAA
951	GCCCCGTCGAT	TGCTGTGGCC	AGTCAAGAAA	AAATACGGCT	CCAGTATTTT
1001	CTGGGGAGAC	CTGATGGTCC	TGACTGGTAA	TGTTGCCCTT	GAATCCATGG
1051	GATT TAAAAC	GCTGGGATTT	GCTGGCGGAA	GAGAAGATGA	CTGGGAGTCG
1101	GACCTGGTAT	ACTGGGGGCC	TGACAACAAG	CCTCTTG CAG	ATAACCGGGA
1151	TAAAAACGGG	AAACTTCAGA	AACCTCTTGC	CGCCACGCAG	ATGGGACTTA
1201	TTTATGTCAA	TCCTGAAGGC	CCCGGTGGAA	AACCAGATCC	TCTGGCTTCC
1251	GCGAAAGATA	TCAGGGAAGC	TTTTTCACGT	ATGGCCATGG	ATGATGAGGA
1301	GACTGTGGCC	CTGATCGCGG	GAGGGCATAC	ATTTGGTAAA	GCACATGGTG
1351	CAGCGTCTCC	TGAAAAATGT	ATTGGCGCAG	GGCCTGATGG	TGCACCTGTG
1401	GAGGAGCAGG	GACTGGGATG	GAAAAATAAA	TGTGGTACAG	GAAACGGCAA
1451	ATATACCATC	ACCAGTGGCC	TGGAAGGAGC	CTGGTCGAC	

FIG. 1

2/2

1	CTGCAGGAGA	TGGAAAAAAA	GCCAAAATAA	AAAATTGCCC	ATCCCAGCGC
51	GCTCCAGCTG	AAAGTAGGCC	TGTTCTGTCC	GGTATTTAAA	TGCATTGACC
101	GTCCCCGTAT	TTAAACAATG	TGATAAATTA	CTCCGTTACC	GGAAAACCGC
151	TGAACAAAAT	TCGGGCTGAA	AAGAGGATCC	GCCGTTATCT	GTTGCATTTC
201	CCCTTAGCCT	GACTAGCCAG	AGACACAATG	ATCTGTGCCG	TTCTGTTAAT
251	ATCAAACCGG	TACTCAATAT	CTTCTCTGGC	GCTGGCTGCC	ATCATCCGGA
301	AGCGTTCGGG	TCGGGATAAA	AAATCGCGCA	GTGCGCCGGT	CCATGCAGAC
351	ACATCCCCCA	CGGGTAACAG	CGTCCCTGTC	ACATTCTTCT	GAATGACATC
401	AGGGATCCCG	CCCGTCTCAC	TGGCGATAAC	GGGCACGCCG	GAGACTGACG
451	CTTCAGCCAG	TACCATACCA	AACGCTTCAT	TTTCCGAAGG	CATGACCACC
501	ACACTGGCAA	TCCGGTAGAC	CGGTAACGCT	GGGAAAAGGG	CACCTGCCAT
551	TAACACATCT	CCGCTCATTC	CCAGGTGTTT	TGTCTGCTGA	CGCAGACGTG
601	CTTCGTATTC	TTCACGCCCG	GCGCCCACCA	CGAGCCAGCG	AAATGATTTC
651	CCTTCCATCT	TCAGCTGATA	CAATACACGC	AGCATAAATT	CATGTCCTTT
701	TTCGGGACGT	AGCATCCCCA	CCTGAACGAT	AAGCGGAACA	TTGTCTGCTG
751	ATGCAGCCCA	GGCGTGGATA	TGCAGGGGTA	ACGGTCGCAT	GGCTTCATTA
801	TGCAATGCGG	GCCAGTCGAA	ACCCGGTGGA	ATAACCGTTA	CCGGTGTCTT
851	GACACCTTCC	GCCATCAGAT	GCGCCATCAT	GGGTGAGATA	GGCACAACAA
901	TGAAATCACA	CAGATAATTC	AGGGAAAACG	TTCTGGTCTT	ACGGGTGATG
951	TAGGTTTTTT	GTCTGACAAT	AGTGAAGCGG	TGACAGCATA	TCAGACGGCT
1001	CAGTCCTGCT	ATATTACTGT	CATGGCCACT	ATGGCAGATG	ACCAGATCAG
1051	GTTTAAATTC	CCCGATAATC	CGTCGAAGTC	TGAGGATGGA	AGGAAGGTGA
1101	AGGCTGTTCC	TGAAAGGAAT	AAAAGTGACA	TCATGCCCTC	TTTTTCTGGC
1151	TTCCGGAGCA	ATTTTACTTT	TTTCTCTGCA	G	

FIG.2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**